

Title	Distance Analysis between Actin and Tropomyosin in Ca ²⁺ Regulated Skeletal Muscle Thin Filament using Isotopically Different Spin Labels
Author(s)	植田, 啓介
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59469
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について ご参照 ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

【51】			
氏 名	うえ だ けい すけ	植 田 啓 介	
博士の専攻分野の名称	博 士（理学）		
学 位 記 番 号	第 2 5 2 1 3 号		
学 位 授 与 年 月 日	平成 24 年 3 月 22 日		
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 理学研究科生物科学専攻		
学 位 論 文 名	Distance Analysis between Actin and Tropomyosin in Ca^{2+} Regulated Skeletal Muscle Thin Filament using Isotopically Different Spin Labels (異核種スピンラベルによる骨格筋細いフィラメントのカルシウム制御におけるアクチン-トロポミオシン間の距離計測)		
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 藤原 敏道 (副査) 教 授 後藤 祐児 准教授 荒田 敏昭		

論 文 内 容 の 要 旨

筋収縮のカルシウム調節の分子機構は、近年トロポニン複合体の結晶構造が解明され、カルシウム結合に伴うトロポニンの力点となる構造変化が明らかになったが、作用点と考えられるトロポミオシンの動きは、よくわかっていない。仮説として、アクチンフィラメント上で、コイルドコイルのトロポミオシンが7個のアクチンサブユニットのミオシン結合領域の蓋となり、ミオシンとアクチンの相互作用をカルシウムイオン依存的に制御している、というものがある。これを確かめるために、骨格筋のカルシウム制御を担う細いフィラメントを構成するアクチンとトロポミオシンの間の相互作用を部位特異的スピンラベルESR法で調べた。まず、10カ所に別々にシステイン変異をいれたトロポミオシンをスピンラベルし、細いフィラメントを再構成して調製し、スピンラベル側鎖の接触による立体障害をESRで調べた。トロポミオシンがアクチンに結合するとその側鎖スピンラベルの運動性はC末端付近で低下するが、その他の大部分ではわずかに低下するのみであった。この結果は、トロポミオシンとアクチンとの結合は極めて弱く、トロポミオシン-トロポミオシンのジャンクション部位でアクチンと結合していることを示している。また、トロポニンとの結合でトロポミオシンのC末領域のスピンラベルの運動性低下がおこるが、カルシウムイオンの添加によって全領域で変化がなく、トロポミオシンのアクチンとの接触状態の変化を検出できなかった。

そこで、次に、トロポミオシンとアクチンC末端（Cys374）との側鎖スピンラベル間距離をESR測定した。 ^{15}N 、 ^{14}N の2つの異なる同位体スピンラベルで別々に標識することを世界で初めて行った。2つのスピンラベルは共鳴磁場強度が異なり、双極子相互作用によるスペクトルブロードニングも、 ^{15}N ラベルが ^{14}N ラベルに比べて極めて大きい。トロポミオシンとアクチンに別々に標識して再構成して得られるESRスペクトルからアクチンのスペクトルを引き算し、トロポミオシンのみの差スペクトルを得ることができた。トロポミオシンのN末端とC末端のスピンラベルとアクチンC末端（Cys374）のスピンラベルでのみ、差スペクトルはブロードニングを示し、解析の結果、距離は約15–18 Åであった。カルシウムイオン添加によって距離は測定限界20 Åを超えた。一方、トロポミオシン中間領域では、距離は

測定限界20 Åを超えた。これらの結果からカルシウム制御の構造基盤となるモデルを提案したい。トロポミオシンとアクチンの結合は弱く、トロポミオシン-トロポミオシンのC末端-N末端ジャンクションでのみアクチンCys374付近で相互作用し、カルシウムイオンによってアクチンのCys374付近から移動して距離は遠くなる。トロポミオシン中間領域ではアクチンから離れているのでスピンラベル間距離は測定限界以上になる。したがって、トロポミオシン全体がカルシウムイオン依存的にアクチンCys374付近から移動し、ミオシンがCys374付近に結合できるようになると考えられる。

論文審査の結果の要旨

筋収縮のカルシウム調節の分子機構は、近年トロポニン複合体の結晶構造が解明され、カルシウム結合に伴うトロポニンの力点となる構造変化が明らかになったが、作用点と考えられるトロポミオシンの動きは、よくわかっていない。本論文では、骨格筋のカルシウム制御を担う細いフィラメントを構成するアクチンとトロポミオシンの間の相互作用を部位特異的スピンラベル ESR 法で調べることに成功し、カルシウム制御の構造基盤となる重要な知見を得、そのモデルを提出している。まず、10 カ所に別々にシステイン変異をいれたトロポミオシンをスピンラベルし、細いフィラメントを再構成して調製し、スピンラベル側鎖の接触による立体障害を ESR で調べた。トロポミオシンがアクチンに結合するとその側鎖スピンラベルの運動性は C 末端付近で低下するが、その他の大部分ではわずかに低下するのみであった。この結果は、トロポミオシンとアクチンとの結合は極めて弱く、トロポミオシン-トロポミオシンの連結部位でアクチンと結合していることを示している。また、トロポニンとの結合でトロポミオシンの C 末領域のスピンラベルの運動性低下がおこるが、カルシウムイオンの添加によって全領域で変化がなく、トロポミオシンのアクチンとの接触状態の変化を検出できなかった。

そこで、次に、トロポミオシンとアクチン C 末端 (Cys374) との側鎖スピンラベル間距離を ESR 測定した。¹⁵N, ¹⁴N の 2 つの異なる同位体スピンラベルで標識することを世界で初めて行った。2 つのスピンラベルは共鳴磁場強度が異なり、双極子相互作用によるスペクトルブロードニングも異なる。そのため、トロポミオシンとアクチンに ¹⁵N ラベルと ¹⁴N ラベルを別々に標識し、再構成して得られる ¹⁵N+¹⁴N の ESR スペクトルから ¹⁴N-アクチンのスペクトルを引き算し、¹⁵N-トロポミオシンのみの差スペクトルを得ることができた。トロポミオシンの N 末端と C 末端のスピンラベルとアクチン C 末端 (Cys374) のスピンラベルでのみ、差スペクトルはブロードニングを示し、解析の結果、距離は約 15-18 Åであった。カルシウムイオン添加によって、その距離は測定限界 20 Åを超えた。一方、トロポミオシン中間領域では、距離はカルシウムイオンに依存せず測定限界 20 Åを超えた。これらの結果からカルシウム制御の構造基盤となるトロポミオシン移動のモデルを提出した。すなわち、トロポミオシンとアクチンの結合は弱く、トロポミオシン-トロポミオシンの C 末端-N末端ジャンクションでのみアクチン Cys374 付近で相互作用し、カルシウムイオンによってアクチンの Cys374 付近から移動して距離は遠くなる。トロポミオシン中間領域ではアクチンから離れているのでスピンラベル間距離は測定限界以上になる。したがって、トロポミオシン全体がカルシウムイオン依存的にアクチン Cys374 付近から移動し、ミオシンが Cys374 付近に結合できるようになると考えられる。

以上のように、本論文は骨格筋カルシウム制御におけるトロポミオシンの動きを ESR により捉え、長年の問題を解明するもので、博士 (理学) の学位論文として十分価値あるものと認める。